Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. A. Kühn

IMMUNZELLEN IM PERIPHEREN BLUT VON PATIENTEN MIT MORBUS CROHN

B - LYMPHOZYTEN, BESTIMMT MIT HILFE VON $F(AB)_2$ - FRAGMENTEN, T - LYMPHOZYTEN UND NULL - ZELLEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Silvia Götz
aus Bad Mergentheim

Würzburg, den 3.12.1979

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0090

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. A. Kühn

IMMUNZELLEN IM PERIPHEREN BLUT VON PATIENTEN MIT MORBUS CROHN

B - LYMPHOZYTEN, BESTIMMT MIT HILFE VON $F(AB)_2$ - FRAGMENTEN, T - LYMPHOZYTEN UND NULL - ZELLEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Silvia Götz
aus Bad Mergentheim

Würzburg, den 3.12.1979

Referent: PD Dr. med. I.O. Auer
Korreferent: Prof. Dr. med. H.A. Kühn
Dekan: Prof. Dr. med. K.H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 2. 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A: ALLGEMEINE PROBLEMSTELLUNG	1
1. Einleitung	1
2. Klinische Aspekte	2
3. Immunpathologische Aspekte	2
4. Spezielle Fragestellung und methodische Zugänge	3
B: EXPERIMENTELLER TEIL	6
1. Probandengut - Methoden	6
1.1. Probandengut	6
1.1.1. Patienten mit M. Crohn	6
1.1.1.1. Gruppe MC 1	6
1.1.1.2. Gruppe MC 2	7
1.1.2. Vergleichskollektive	7
1.1.2.1. Gruppe E	7
1.1.2.2. Gruppe N	8
1.2. Methoden	8
1.2.1. Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	8
1.2.2. Bestimmung der B - Lymphozyten	9
1.2.3. Bestimmung der T - Lymphozyten (Schafserythrozytenbindende, sog. E - Rosetten bildende Zellen)	11
1.2.4. Bestimmung der Null - Lymphozyten	12
1.2.5. Bestimmung der Gesamtlymphozytenzahl	12
1.3. Statistik	12
2. Ergebnisse	13
2.1. Lymphozyten	13
2.2. Relativkonzentrationen	13
2.2.1. B - Lymphozyten	13

Seite

2.2.2. T - Lymphozyten 14
2.2.3. Null - Lymphozyten 15

2.3. Absolutkonzentrationen 15
2.3.1. B - Lymphozyten 15
2.3.2. T - Lymphozyten 15
2.3.3. Null - Lymphozyten 17
2.3.4. Korrelation der Lymphozytensubpopulationen zu den Gesamtlymphozyten 17

2.4. Einfluß klinischer Parameter 19
2.4.1. Krankheitsaktivität 19
2.4.1.1. Gruppe MC 1 19
2.4.1.2. Gruppen MC 2 und MC 23
2.4.2. Krankheitsdauer 23
2.4.3. Lokalisation 23

C: DISKUSSION 25

1. Die B - Lymphozytose 25
2. Die T - Lymphozytose 27
3. Einflüsse verschiedener klinischer Parameter 28
3.1. Krankheitsaktivität 28
3.2. Krankheitsdauer 29

D: ZUSAMMENFASSUNG 32

A: ALLGEMEINE PROBLEMSTELLUNG

1. Einleitung

Die von B. Crohn et al. 1932 beschriebene chronische Entzündung des Gastrointestinaltraktes ist in ihrer Ätiologie bis heute ungeklärt. Die Chronizität des Leidens, das Auftreten von systemischen Komplikationen und das gute Ansprechen auf Steroide deuten auf ein immunologisches Geschehen hin (Schettler et al., 1976). Das histopathologische Substrat, das Erscheinen von zirkulierenden Immunkomplexen (Doe et al., 1973; Hodgson et al., 1977) und einer zytotoxischen Wirkung peripherer Blutlymphozyten auf Colonepithelien (Watson and Shorter, 1975), die möglicherweise durch einen antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizitätsmechanismus (Shorter et al., 1971; Stobo et al., 1976) vermittelt wird, sprechen für eine mögliche pathogenetische Rolle der humoralen Immunität. Dies macht die zentrale Rolle des Lymphozyten deutlich. Daher stellt sich diese Arbeit die Aufgabe, die Träger der humoralen Immunität, d.h. die B - Lymphozyten sowie ergänzend auch die T - und Null - Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn (MC) zu bestimmen. Die numerische Verteilung der Lymphozyten wurde zwar schon mehrmals untersucht, führte jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen mit erhöhten (Sachar et al., 1976; Auer et al., 1976), normalen (Strickland et al., 1974; Thayer et al., 1976) und erniedrigten (Hoj and Freiesleben, 1976) B - Zellzahlen.

2. Klinische Aspekte

Die Enteritis regionalis ist eine unspezifische chronische Entzündung des Darmes mit Befall vorwiegend des terminalen Ileums (Fahrländer und Shalev, 1974). In der Reihenfolge der Häufigkeit erkranken außerdem Colon, Anus, präterminales Ileum, Jejunum, Rektum, Appendix, Duodenum und in seltensten Fällen das Antrum, Lippen- und Mundschleimhaut (Schiller et al., 1971). Die Krankheit kann in jedem Alter auftreten, bevorzugt sind jedoch junge Menschen im Alter von 15 bis 35 Jahren. Sie verläuft meist langsam progredient, häufig in Schüben. Der Patient wird oft durch reduziertes Allgemeinbefinden, Schmerzen und Durchfälle zum Arzt geführt. Außerdem treten Fieber, okkulte oder selten massive Blutungen, gelegentlich eine druckempfindliche Resistenz im Bereich der befallenen Dünndarmschlinge, meist im rechten Unterbauch, auf. Als Komplikationen sind Abszedierungen, perianale Fissuren und Fistelbildungen besonders zu erwähnen. Die klinische Symptomatologie kann auch in Form extraintestinaler Begleiterscheinungen wie Polyarthritis mit Gelenkschmerzen, Fieber und rascher Ermüdbarkeit auftreten und somit die Diagnosestellung um Jahre verzögern. Karzinomatöse Entartung ist ebenfalls bekannt.

3. Immunpathologische Aspekte

Histopathologisches Substrat

Die transmurale Entzündung kann mehrere Darmsegmente befallen, die vom gesunden Gewebe scharf abgegrenzt sind (skip lesions). Sie führt zur Verdickung der erkrankten Darmwandschichten, die ins Lumen vorspringen

und röntgenologisch als das sog. "Pflastersteinmuster" nachweisbar sein können. Das entzündliche Infiltrat enthält reichlich Lymphozyten und Plasmazellen, vereinzelt auch eosinophile Granulozyten (Lockhart - Mummery, 1964). Als Charakteristikum findet man in 5o - 7o% der Fälle epitheloidzellige, nicht verkäsende Granulome mit Riesenzellen, die auch in den zugehörigen Lymphknoten nachweisbar sein können (Morson, 1968).

Immunologische Veränderungen

Während in der normalen Mukosa die verschiedenen Zellarten (Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen) getrennt nebeneinander liegen (Eidelmann and Lagunoff, 1972), sind im entzündlichen Infiltrat des M. Crohn die Lymphozyten dicht von Makrophagen und Epitheloidzellen umgeben(Aluwihare, 1971). Die Zahl der Plasmazellen in der Lamina propria übersteigt die Zahl der Lymphozyten, was möglicherweise auf antigene Stimulation zurückzuführen ist (Ferguson et al., 1975). Außerdem finden sich in der Rektumbiopsie von Crohn - Patienten signifikant mehr Makrophagen als beim gesunden Vergleichskollektiv (Sommers and Korelitz, 1975); ebenso ist die Zahl der Mastzellen bei Patienten mit inaktivem Krankheitsverlauf im Vergleich zu Gesunden erhöht (Sommers and Korelitz, 1975).

-. [illegible]

Kürzlich stellte sich heraus, daß die menschlichen B - Lymphozyten, die bekanntlich in der Zellmembran inkorporiertes Oberflächenimmunglobulin (surface membrane immunoglobulin, SmIg) tragen, nur etwa ein Drittel der peripheren Blutlymphozyten darstellen, bei denen fluoreszenzmikroskopisch Oberflächenimmunglobulin "leicht" nachweisbar (easily detectable) ist (Alexander and

Sander, 1977; Lobo and Horwitz, 1976; Sedlacek et al., 1976; Winchester et al., 1975 und 1976). SmIg-negative lymphoide Zellen, die sowohl zytophiles menschliches Ig (Alexander and Sander, 1977; Lobo and Horwitz, 1976; Sedlacek et al., 1976; Winchester et al., 1976) als auch in Immunkomplexen vorliegende Antikörper (Alexander and Sander, 1977; Sedlacek et al., 1976; Winchester et al., 1975) mit dem Fc-Teil an einen sog. Fc-Rezeptor binden, führen zu falsch positiven Ergebnissen in der B - Zellbestimmung. Auch Autoantikörper gegen Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn (Lancet, Editorial 1976) täuschen möglicherweise Membran-Immunglobulin vor (Winchester et al., 1974). Vorinkubation der peripheren Blutlymphozyten bei 37°C entfernt zwar exogenes menschliches Immunglobulin (Alexander and Sander, 1977; Lobo and Horwitz, 1976; Sedlacek et al., Winchester et al., 1976) und Lymphozytentoxine (Winchester et al., 1974), begünstigt jedoch möglicherweise die unspezifische Bindung von Kaninchen-IgG (Sedlacek et al., 1976). Ziegen-IgG wiederum scheint wohl eine geringere Affinität zu Fc-Rezeptoren zu haben (Alexander and Sander, 1977); aber bei Bestimmung des SmIg mit diesem Antikörperkonjugat können sich Antigen-Antikörperkomplexe bilden, und zwar mit den sich von der Zelloberfläche lösenden Antigenen. Diese Immunkomplexe binden sich nun ihrerseits über den Fc-Rezeptor an die Zelle (Alexander and Sander, 1977).

Aufgrund dieser Fehlerquellen kann man den widersprüchlichen Aussagen früherer Studien nicht allzuviel Bedeutung beimessen. Da überdies jetzt bessere Techniken für die B - Zellbestimmung zur Verfügung stehen, untersuchten wir die numerische Verteilung der B - Zellen bei M. Crohn erneut, und zwar im Vergleich zu geschlechts-

und altersgleichen gesunden Kontrollpersonen und zu Patienten mit akuten entzündlichen Darmerkrankungen außer M. Crohn und Colitis ulcerosa (CU). Um die unspezifische Bindung von Antikörpern über den Fc-Rezeptor zu vermeiden, benützten wir die $F(ab)_2$-Teile von Kaninchenantikörpern. Außerdem wurden die Zellen bei $37^{o}C$ vorinkubiert, um Lymphozytentoxine und exogenes Immunglobulin zu eluieren.
Der Vollständigkeit halber bestimmten wir gleichzeitig die mit Schafserythrozyten (sheep red blood cells, SRBC) rosettierenden peripheren Blutlymphozyten, um so die Zahl der T - Zellen festzustellen. Auf diese Weise konnte auch die Fraktion der Lymphozyten ermittelt werden, die diese beiden Oberflächenmarker nicht besitzt; diese non-T- , non-B - Zellen werden in der Gruppe der Null - Zellen zusammengefaßt (Winchester et al., 1975; Schlossmann and Chess, 1976).

Um verbindliche Aussagen über die numerische Verteilung der Lymphozytensubpopulationen zu erhalten, gliederten wir das sehr heterogene Kollektiv der Crohn - Patienten in eine Gruppe MC 1 mit erstdiagnostizierter und kurzdauernder Krankheit ohne vorangegangene Therapie und eine Gruppe MC 2 mit bereits länger bestehendem Leiden, das schon behandelt worden war. Diese Einteilung erlaubte uns festzustellen, ob numerische Veränderungen der Lymphozytenzahlen primär vorliegen oder sekundär auftreten; sie machte außerdem eine Beurteilung der Abhängigkeit der Lymphozytenzahlen von verschiedenen klinischen Parametern wie Dauer, Aktivität und Therapie der Krankheit möglich.

B: EXPERIMENTELLER TEIL

1. Probandengut - Methoden

1.1. Probandengut

Alle in der Studie untersuchten Patienten gaben nach Information über Ablauf und Zweck der Untersuchung ihre Zustimmung. Keiner von ihnen nahm zum Zeitpunkt des Tests Medikamente wie Salicylazosulfapyridin (SASP), Steroide oder Azathioprin ein.

1.1.1. Patienten mit M. Crohn

Es wurden 28 Patienten untersucht, deren Krankheit klinisch, röntgenologisch und in 15 Fällen histologisch gesichert war. Keiner der Patienten war darmreseziert oder innerhalb der vorangegangenen sechs Monate anderweitig operiert worden.

Die Krankheitsaktivität wurde gemäß den Kriterien der "National Cooperative Crohn's Disease Study" (Best et al., 1976) ermittelt. Ein Aktivitätsindex (Crohn's Disease Activity Index, CDAI) von weniger als 150 wurde als Kennzeichen eines inaktiven, ein CDAI von mehr als 150 als Kennzeichen eines aktiven Krankheitsgeschehens betrachtet.

Die als Gesamtkollektiv geführte Gruppe der 28 Patienten wurde in zwei Untergruppen, Gruppe MC 1 und Gruppe MC 2 unterteilt.

1.1.1.1. Gruppe MC 1:
Patienten mit neu erkannter, erst kürzlich diagnostizierter Krankheit
n = 14

mittlere Krankheitsdauer: 12,7 ± 8,5 Monate
mittleres Alter: 27,4 ± 11,1 Jahre (15 - 43 J.)

Die Patienten waren bislang nie mit SASP, Azathioprin oder Steroiden therapiert worden.
In vier Fällen war das Ileum, in acht Fällen Dünn- und Dickdarm, in zwei Fällen das Colon allein befallen.
Bei 7 Patienten wurde ein CDAI ≤ 15o, bei 7 Patienten ein CDAI > 15o ermittelt.

1.1.1.2. Gruppe MC 2:

Patienten mit schon länger bekannter und bereits therapierter Krankheit
n = 14
mittlere Krankheitsdauer: 61,6 ± 31,8 Monate
mittleres Alter: 33,6 ± 1o,6 Jahre (18 - 55 J.)

11 Patienten hatten SASP erhalten, 7 von ihnen standen zusätzlich unter Steroidtherapie. Ein Patient war nur mit Steroiden behandelt worden. Alle Medikamente waren mindestens 3 Wochen vor dem Test abgesetzt worden.
In 3 Fällen war das Ileum, in 6 Fällen Ileum und Colon, in 3 Fällen nur das Colon befallen.
Bei 6 Patienten wurde ein CDAI ≤ 15o, bei 8 Patienten ein CDAI > 15o ermittelt.

1.1.2. Vergleichskollektive

1.1.2.1. Gruppe E ("Erkrankte"):

Patienten, die an anderen entzündlichen Darmerkrankungen außer M. Crohn und Colitis ulcerosa erkrankt waren
n = 13
mittleres Alter: 45,9 ± 14,7 Jahre (24 - 65 J.)

6 Patienten waren an einer Salmonellose, einer von ihnen an Typhus erkrankt. Bei 3 Personen handelte es sich um

eine unspezifische Gastroenteritis, bei 2 um eine bakterielle Superinfektion nach Antibiotikatherapie. Bei 2 Kranken war die Gastroenteritis zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht näher abgeklärt.

1.1.2.2. Gruppe N ("Normalpersonen"):
Alters- und geschlechtsgleiche gesunde Personen, die gleichzeitig mit den entsprechenden Patienten untersucht wurden

- Gruppe NMC 1 (mittleres Alter: 26,7 ± 4,4 Jahre) entsprechend Gruppe MC 1
- Gruppe NMC 2 (mittleres Alter: 29,4 ± 7,3 Jahre) entsprechend Gruppe MC 2
- Gruppe NE (mittleres Alter: 4o,o ± 19,o Jahre) entsprechend Gruppe E

1.2. Methoden

1.2.1. Gewinnung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Gewinnung der mononukleären Zellen erfolgte mittels der von Boyum (1968) beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation.

Heparinisiertes venöses Blut (1o I.E. Heparin/ml Blut) wird mit Poly-L-Lysin beschichteten Karbonyleisenpartikeln (Lymphocyte Seperator Reagent, Technicon Instruments Corp., Tarrytown, USA) im Verhältnis von 1:4 gemischt und 9o min lang unter ständiger Rotation bei 37°C inkubiert. Die Zell-Karbonyleisen-Suspension wird auf einen Ficoll-Natrium-Metrizoat-Gradienten (spezifisches Gewicht: 1o77 g/l) geschichtet (2 Volumina Zell-Eisen-Suspension auf 1 Volumen Ficoll-

Lösung). Nach 3o min Zentrifugation mit 4oo g bei 2o°C wird das makrophagenverarmte, mononukleäre Zellen enthaltende Band mit einer Pasteurpipette in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) aufgenommen und resuspendiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen in PBS (die Thrombozyten werden durch Zentrifugation bei 2oo g entfernt) werden die Zellen in RPMI 164o Medium (Grand Island Biological Corporation, GIBCO, Grand Island, N.Y., USA), das mit N-2-Hydroxyacethylpiperazin-n-2-äthansulfonsäure (HEPES) versetzt ist, aufgenommen.
Die Ausbeute liegt bei 55 - 75%, die Lebensfähigkeit der Zellen (im Trypanblau-Ausschlußverfahren bestimmt) bei 98%.

1.2.2. Bestimmung der B - Lymphozyten

Die Bestimmung der SmIg - positiven Zellen wurde nach dem von Pernis et al. (1971) beschriebenen Immunfluoreszenztest mit Fluorisothiocyanat- (FITC) -konjugierten Antikörperfragmenten vorgenommen und folgendermaßen modifiziert:
Die phagozytenverarmte, in RPMI 164o plus HEPES plus 1o% fetalem Kälberserum (FKS) aufgenommene Zellsuspension wird über Nacht bei 37°C in einer 95% O_2/5% CO_2 - Atmosphäre inkubiert, um kältereaktive Autoantikörper gegen Lymphozyten sowie autologes Serumimmunglobulin zu eluieren (Lobo et al., 1975; Winchester et al., 1974,1975,1976).

Monospezifische $F(ab)_2$-Fragmente von Immunglobulin G von Kaninchenhyperimmunseren gegen IgG, IgM und IgA wurden nach Reid (1971) gewonnen, analysiert und mit FITC konjugiert (Behringwerke, Marburg). Die in Vorversuchen ermittelten geeigneten Verdünnungen der FITC-Konjugate gegen IgM (F/P: 1,5; Gesamtproteingehalt: 22 mg/ml; Antikörpergehalt ca. 6,o mg/ml), IgG (F/P: 1,5; Gesamtproteinge-

halt: 32 mg/ml; Antikörpergehalt ca 3,5 mg/ml) und IgA (F/P: 1,o; Gesamtproteingehalt: 32 mg/ml;Antikörpergehalt ca. 2,o mg/ml) werden mit einer Mischung aus PBS (pH 7,8) und 5% FKS direkt vor Durchführung des Versuchs bei $4^{o}C$ hergestellt.

o,1 ml der vorinkubierten Lymphozytensuspension (2o - 3o×1o^{6}/ml) werden in RPMI 164o plus NaN_3 (1o mM) bei 4oo g und $37^{o}C$ gewaschen und anschließend in o,1 ml der entsprechenden Verdünnung der FITC - $F(ab)_2$ - Fragmente aufgenommen. Es folgen die Inkubation bei $4^{o}C$ im Dunkeln für 3o min und daraufhin dreimaliges Waschen bei $4^{o}C$ in RPMI 164o plus NaN_3. Ein Tropfen der resuspendierten Zellsuspension wird auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Zur Auszählung wurde ein Leitz-Orthoplanmikroskop verwendet, das mit einer HgO 2oo-Super-Quecksilberdampflampe ausgestattet war (KP 49o Interferenzfilter, K 51o Sperrfilter).
Es werden mindestens 5oo Zellen ausgezählt. Nicht entfernte Makrophagen können auf Grund phagozytierter oder adhärenter Eisenpartikel morphologisch erkannt und somit von den B - Lymphozyten unterschieden werden.

Der Anteil der fluoreszeierenden Zellen wird als Prozentsatz der B-Zellen betrachtet und mittels der Gesamtlymphozytenzahl auf Absolutwerte umgerechnet.

1.2.3. Bestimmung der T - Lymphozyten (Schafserythrozyten bindende, sog. E-Rosetten bildende Zellen)

Der Anteil der Schafserythrozyten bindenden Zellen wurde nach Mendes et al. (1973) ermittelt. Nach der Modifikation von Galili und Schlesinger (1974) werden die Schafserythrozyten mit Neuraminidase vorbehandelt; dies führt zu einer Erhöhung der Zahl und einer Steigerung der Stabilität der Rosetten.

Die in Alsevers-Lösung bei 4°C gelagerten SRBC (Verwendung innerhalb von 14 Tagen nach Blutentnahme vom Schaf) werden zweimal in Minimal Essential Medium (MEM, Mediapharm, Aschaffenburg) gewaschen (67o g, 2o°C, 5 - 8 min). o,25 ml der anschließend bei 67o g gepackten Erythrozyten werden mit o,25 ml eines Calcium-Kochsalz-Puffers (NaCl: o,145 M, $CaCl_2$: o,oo3 M; $NaHCO_3$: o,oo4 M) versetzt. Dazu werden 45 I.E. Neuraminidase aus Vibrio cholerae (Behringwerke, Marburg) gegeben. Nach Inkubation der Suspension im Wasserbad (37°C, 2o min, Schütteln nach 1o min) werden die Zellen dreimal in MEM gewaschen und auf eine o,5%ige Suspension in MEM eingestellt.

o,1 ml der makrophagenverarmten Lymphozytensuspension wird mit o,1 ml der Erythrozytensuspension in silikonbeschichteten Rundbodengläschen gemischt, bei 2oo g und 2o°C 5 min lang zentrifugiert und inkubiert (1 Stunde, 2o°C). Das Zellpellet wird vorsichtig resuspendiert und ein Tropfen der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben.
Es werden 3oo Zellen ausgezählt. Alle Lymphozyten, die drei oder mehr Schafserythrozyten angelagert haben, werden als T-Zellen gewertet.

Die absolute T-Zellkonzentration kann mittels des so bestimmten Prozentsatzes der E-Rosetten und über die Gesamtlymphozytenzahl errechnet werden. Der Ausschluß der Mono-

zyten führte zu etwas höheren Werten als in früheren Veröffentlichungen.

1.2.4. Bestimmung der Null - Lymphozyten

Durch Subtraktion der ermittelten Anteile der B- und T-Lymphozyten von 1oo% erhält man den Anteil der Null-Zellen, der über die absolute Lymphozytenzahl auf den Absolutwert umgerechnet werden kann.

1.2.5. Bestimmung der Gesamtlymphozytenzahl

Die Gesamtzahl der Lymphozyten wurde durch Auswertung von 2oo Leukozyten auf nach May-Grünwald und Giemsa gefärbten Vollblutausstrichen ermittelt.

1.3. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte an der Rechenanlage TR 44o der Universität Würzburg. Dafür wurden alle Variablen (ca. 8o) in ALGOL in Lochkarten gestanzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ($\bar{x}$) $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes (standard deviation, SD) angegeben. Die Signifikanzen der Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen und den gleichzeitig getesteten Normalpersonen wurden im WILCOXON-Vorzeichen-Rang-Test (WVRT, zweiseitig) errechnet. Alle anderen Signifikanzen wurden, da die Daten in den verschiedenen Kollektiven keine Normalverteilung zeigten, unter Verwendung des WILCOXON-Zweistichproben-Tests (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig) erhalten. Korrelationsuntersuchungen wurden im SPEARMAN-Rang-Korrelationstest (zweiseitig) durchgeführt.

2. Ergebnisse

2.1. Lymphozyten

Die Absolutwerte der Lymphozyten waren in Gruppe MC1 annähernd normal (Tab. 1), während sie in MC 2 gegenüber den gesunden und erkrankten Kontrollen sowie gegenüber Gruppe MC 1 signifikant erniedrigt waren (Tab. 1). In der Gesamtgruppe MC ergab sich eine Tendenz zu subnormalen Werten.
Eine signifikante Lymphozytose gegenüber der Gesamtgruppe der Crohnpatienten, gegenüber MC 1, MC 2 und dem Kontrollkollektiv NE wurde bei Gruppe E beobachtet.

2.2. Relativkonzentrationen

2.2.1. B - Lymphozyten

Es ergab sich eine signifikante relative Gesamt-B-Lymphozytose in Gruppe MC 1, während Gruppe MC 2 eine starke Tendenz zu subnormalen Relativwerten zeigte, die nur knapp die Signifikanz verfehlte (Tab. 1). Dieser divergierende Trend führte zu einem signifikanten Unterschied der Prozentsätze der Gesamt-B-Zellen zwischen den beiden Crohnkollektiven; der Mittelwert in der Gesamtgruppe MC war mit stark streuenden individuellen Werten normal (Tab. 1).
Wie Abb. 1 zeigt, entsteht die signifikante relative B - Lymphozytose in Gruppe MC 1 durch die etwa gleichmäßige Erhöhung der Zellzahlen in allen drei B-Untergruppen; die Erniedrigung der relativen B-Zellkonzentrationen in Gruppe MC 2 wird ebenfalls von den drei Untergruppen gleichmäßig getragen. Der Vergleich der beiden Kollektive MC 1 und MC 2 ergab einen signifikant höheren Anteil der IgM-tra-

genden Zellen in Gruppe MC 1 ($p < 0{,}05$).

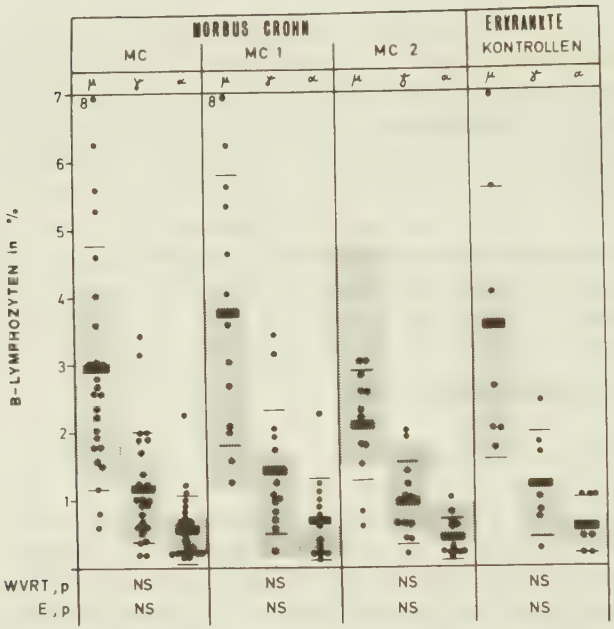


Abb. 1: Relative Konzentrationen der einzelnen B - Lymphozytensubgruppen bei M. Crohn und Kontrollen. Punkte: Patienten. Raster: $\bar{x} \pm 1$ SD des entsprechenden Normalkollektivs.

2.2.2. T - Lymphozyten

Nicht signifikant unterschieden sich die Prozentsätze der T-Lymphozyten beim Vergleich der verschiedenen Patienten-

gruppen untereinander und mit den Kontrollkollektiven. Es fand sich lediglich ein leichter Abfall der T-Zellen in Gruppe MC 2 (Tab. 1).

2.2.3. Null-Lymphozyten

Auch bei den Null-Lymphozyten zeigten sich im Vergleich der verschiedenen Patienten- und Kontrollkollektive keinerlei signifikanten Unterschiede.

2.3. Absolutkonzentrationen

2.3.1. B - Lymphozyten

Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, war die Gesamt-B-Lymphozytenzahl im Kollektiv MC 2 gegenüber den alters- und geschlechtsgleichen Normalpersonen, der Gruppe E und der Gruppe MC 1 signifikant erniedrigt. Im letztgenannten Kollektiv zeigte sich ein leichter Trend zu höher als normalen Zellzahlen. Deutlich erhöhte B-Zellkonzentrationen fanden wir bei den erkrankten Kontrollen (Gruppe E), ohne daß wir, wohl auf Grund der niedrigen Patientenzahlen, eine Signifikanz nachweisen konnten. Die Veränderungen der B-Zellwerte in Gruppe MC 1 und MC 2 sind auf gleichmäßige Veränderungen in allen drei B-Untergruppen zurückzuführen. (Abb. 2).

2.3.2. T - Lymphozyten

In Gruppe MC 2 zeigte sich zu der absoluten B-Lymphopenie auch eine absolute T-Lymphopenie gegenüber den Normalpersonen und den Gruppen MC 1 und E. Bei den erstdiagnostizierten Crohnpatienten (MC 1) dagegen fanden wir keine signifikanten Veränderungen. Eine absolute T-Lymphozytose

war bei den erkrankten Kontrollen (E) im Vergleich zu den alters- und geschlechtsgleichen Normalpersonen ($p<0,05$), zu den Gruppen MC 2 und MC festzustellen (Tab. 1, Abb. 3).

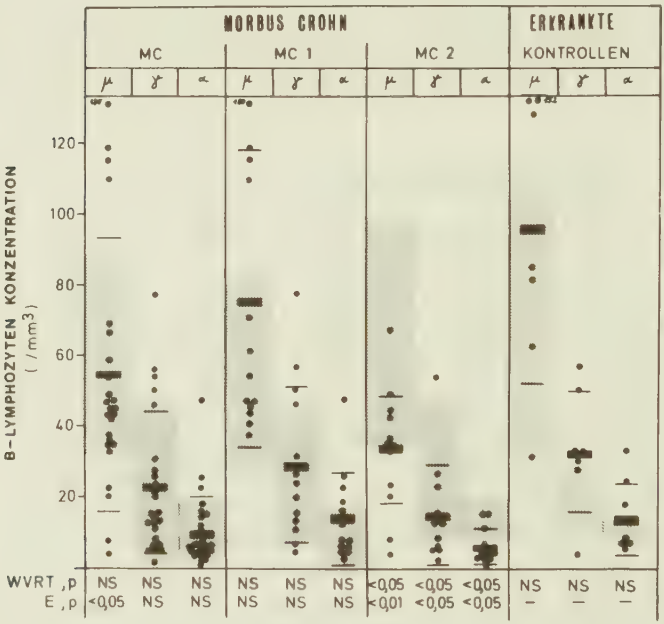
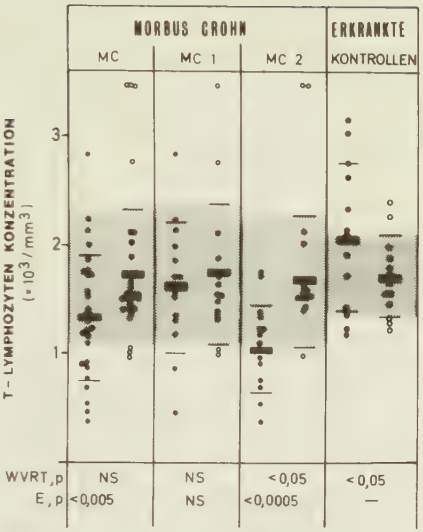


Abb. 2: Absolute Konzentrationen der einzelnen B-Lymphozytensubgruppen bei M. Crohn und Kontrollen. Punkte: Patienten. Raster: $\bar{x} \pm 1$ SD des entsprechenden Normalkollektivs.

Abb. 3:

Absolute T-Lymphozyten-konzentrationen bei M. Crohn und Kontrollen. Punkte: Patienten. Kreise: Normalkontrollen. Raster: $\bar{x} \pm 1$ SD des entsprechenden Normal-kollektivs.



2.3.3. Null-Lymphozyten

Die Absolutwerte waren in den verschiedenen Gruppen vergleichbar.

2.3.4. Korrelation der Lymphozyten-Subpopulationen zu den Gesamtlymphozyten

Die absoluten B- , T- und Null-Zellkonzentrationen korrelierten positiv mit den Gesamtlymphozyten. Eine Ausnahme hiervon machten die B-Zellen bei Gruppe MC 1; dies ist wohl auf die signifikante relative B-Lymphozytose in dieser Gruppe zurückzuführen.

	Morbus Crohn					Erkrankte Kontrollen		
	MC	NMC	MC 1	NMC 1	MC 2	NMC 2	E	NE
Lymphoz. abs.	1858 ±788	<o,1 2296 ±728	22o2[a] ±785	<o,o5 2253 ±836	1515[a,b] ±649	<o,o5 2339 ±632	2971[b] ±84o	<o,o5 2472 ±542
B-Lymphoz. abs.	88[e] ± 65	92 ± 46	1o1[f] ± 75	86 ± 43	54[d,f] ± 29	98 ± 47	144[d,e] ± 58	1o1 ± 48
%	4,8 ± 2,77	4,3 ± 2,3	6,o[c] ± 3,44	<o,o5 3,95 ± 1,87	3,4[c] ± 1,o1	<o,1 4,55 ± 2,o5	5,36 ± 2,97	4,21 ± 1,52
T-Lymphoz. abs.	1339[h] ±567	1718 ±626	1622[i] ±592	1736 ±669	1o57[g,i] ±4o8	<o,o5 1698 ±6o3	2o93[g,h] ±684	<o,o5 1721 ±374
%	72,47 ± 7,67	73,85 ± 8,46	73,74 ± 5,o5	73,64 ± 8,69	69,47 ± 9,72	74,o8 ± 8,55	7o,35 ± 9,5	7o,47 ± 7,91
Null-Lympho. abs.	473 ±282	443 ±244	454 ±227	473 ±29o	418 ±341	41o ±183	59o ±165	489 ±185
%	22,92 ± 7,28	2o,28 ± 7,58	2o,52 ± 4,83	21,2o ± 8,15	25,52 ± 8,71	19,19 ± 7,o6	21,17 ± 5,2o	2o,36 ± 6,8o

a) MC 1 vs. MC 2, p<o,oo5 d) MC 2 vs. E , p<o,oo5 g) MC 2 vs. E , p<o,oo5
b) MC 2 vs. E , p<o,oo1 e) MC vs. E , p<o,o5 h) MC vs. E , p<o,o5
c) MC 1 vs. MC 2, p<o,o5 f) MC 1 vs. MC 2, p<o,o1 i) MC 1 vs. MC 2, p<o,o5

Tab. 1: Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen bei M. Crohn und Kontrollen.
Alle Angaben: $\bar{x} \pm 1$ SD

2.4. Einfluß klinischer Parameter

2.4.1. Krankheitsaktivität

2.4.1.1. Gruppe MC 1

Bei Patienten mit erstdiagnostizierter inaktiver Krankheit (CDAI < 15o) fanden wir eine signifikante absolute Lymphozytose (Tab. 2a), die durch B- und T-Lymphozyten verursacht war (Tab. 2a, Abb. 4a und 4b). Dieses Verteilungsmuster glich dem der Patienten mit anderen entzündlichen Darmerkrankungen außer M. Crohn und Colitis ulcerosa (Gruppe E).

Die Relativanteile der T-Zellen waren im Kollektiv MC 1 mit inaktivem Krankheitsgeschehen normal; die Relativanteile der B-Zellen jedoch waren signifikant erhöht (Tab. 2a). Erniedrigt war hingegen der Prozentsatz der Null-Lymphozyten, ohne daß dies bei den Absolutwerten der Fall gewesen wäre (Tab. 2a).

Die Erhöhung der B-Zellen wurde sowohl bei den Relativ- als auch bei den Absolutwerten gleichmäßig von allen drei B-Untergruppen getragen (Tab. 2a).

Bei den MC 1 - Patienten mit aktivem Krankheitsgeschehen (CDAI >15o) stellte sich eine signifikante absolute Lymphopenie gegenüber den Patienten derselben Gruppe mit inaktivem Leiden heraus ($p < o,o5$; Tab. 2a und 2b); auch die Zahl der T-Zellen war signifikant erniedrigt (Tab. 2b und Abb. 4a). Die Absolutwerte der B-Zellen zeigten sich ebenfalls erniedrigt (gleichmäßiger Abfall der Zellzahlen in allen drei B-Unterklassen); allerdings war statistisch keine Signifikanz nachzuweisen (Abb. 4b).

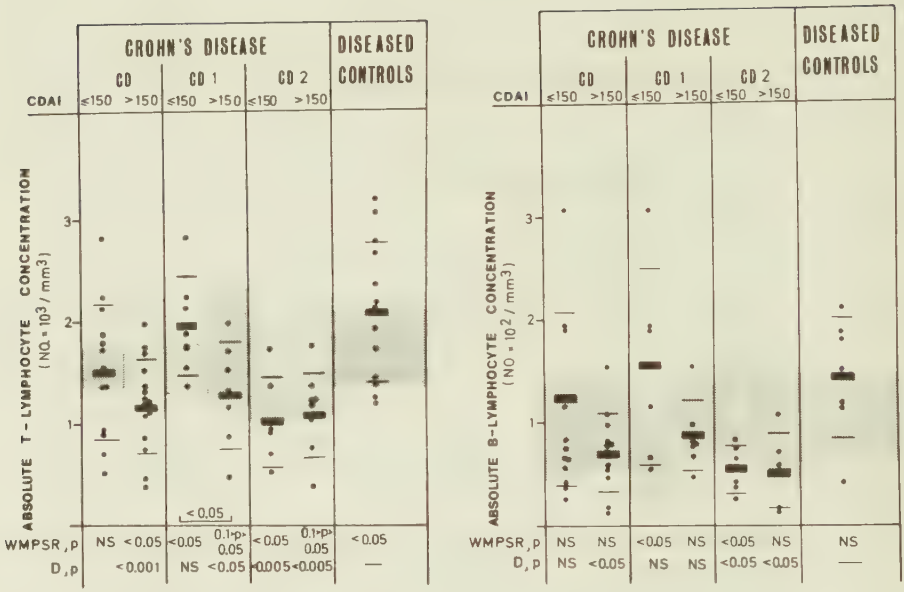


Abb. 4 a und b:

Absolute Konzentrationen der T- und B-Lymphozyten bei Patienten mit aktivem und inaktivem M. Crohn und Patienten der Gruppe E.
Punkte: Patienten. Raster: $\bar{x} \pm 1$ SD des entsprechenden Normalkollektivs.
Crohn's disease = M. Crohn, diseased controls = erkrankte Kontrollen, CD = MC, CD 1 = MC 1, CD 2 = MC 2, D = E, WMPSR = WVRT

Im Vergleich der aktiven MC 1 - Patienten zur Kontrollgruppe NMC 1 fanden wir annähernd vergleichbare Absolutwerte der B-Zellen (Tab. 2b, Abb. 4b) und Null-Lymphozyten (Tab. 2b) sowie leicht erniedrigte absolute T-Zellzahlen (Tab. 2a, Abb. 4a).

CDAI ≤ 150

		NMC 1 n = 7		MC 1 n = 7		MC 2 n = 6		NMC 2 n = 6	
Lymphoz.	abs.	2283 ±481	<0,05	2641 ±599	<0,05	1389 ±575	<0,05	2286 ±424	
B-Zellen	%	3,25± 2,21	<0,05	6,6 ± 4,7		3,88± 0,35		5,12± 2,31	
	abs.	74 ± 45	<0,05	154 ± 95	<0,05	55 ± 23	<0,05	104 ± 46	
μ	%	1,21± 1,38	<0,1	3,99± 2,74		2,58± 0,29		3,24± 1,66	
	abs.	49 ± 29	=0,05	94 ± 54	<0,05	37 ± 17		69 ± 33	
γ	%	0,73± 0,82	<0,05	1,8 ± 1,3		0,86± 0,39		1,11± 0,59	
	abs.	15 ± 17	<0,05	41 ± 27	<0,05	11 ± 7	<0,05	23 ± 12	
α	%	0,30± 0,11	=0,05	0,85± 0,76		0,40± 0,33		0,76± 0,23	
	abs.	7 ± 2	<0,1	20 ± 17	<0,05	6 ± 5	<0,05	13 ± 5	
T-Zellen	%	70,02± 7,42		73,14± 4,49		73,26± 3,55		71,86± 4,02	
	abs.	1610 ±256	<0,05	1952 ±489	<0,05	1023 ±433	<0,05	1522 ± 49	
Null-Z.	%	25,08± 4,85	<0,05	19,87± 4,4		22,85± 3,58		22,60± 4,32	
	abs.	578 ±262		537 ±216		314 ±121		487 ±141	

Tab. 2a: Einfluß der Krankheitsaktivität bei Patienten mit M. Crohn auf die Lymphozyten und ihre Subpopulationen
Alle Angaben: $\bar{x} \pm 1$ SD

CDAI > 15o

		NMC 1 n = 7	MC 1 n = 7		MC 2 n = 8		NMC 2 n = 8	
Lymphoz.	abs.	2223 ±1131	1761 ±723		16o9 ±723		2378 ±781	
B-Zellen	%	4,63± 1,51	5,35± 1,74	<o,o5	3,o3± 1,3		4,47± 2,12	
	abs.	99 ± 41	87 ± 34		54 ± 37		97 ± 56	
μ	%	2,89± 1,43	3,66± 1,45	<o,o5	1,58± o,85		2,88± 1,62	
	abs.	59 ± 24	58 ± 25		29 ± 19		62 ± 34	
γ	%	1,o3± o,83	1,o9± o,43		1,o1± o,77		1,19± o,78	
	abs.	27 ± 29	19 ± 9		19 ± 19		3o ± 27	
α	%	o,43± o,26	o,59± o,43		o,43± o,27		o,4 ± o,25	
	abs.	12 ± 11	9 ± 8		6 ± 4		9 ± 5	
T-Zellen	%	77,65± 8,44	73,81± 5,9		7o,12± 12,72		75,47± 1o,5o	
	abs.	1832 ± 915	<o,1 1299	±513	1o82 ±4o9		1798 ±767	
Null-Z.	%	18,o7± 9,32	2o,83± 5,5		28,8o± 11,71	<o,o5	17,34± 7,95	
	abs.	381 ±3oo	383 ±227		521 ±465		345 ±2oo	

Tab. 2b: Einfluß der Krankheitsaktivität bei Patienten mit M. Crohn auf die Lymphozyten und ihre Subpopulationen
Alle Angaben: $\bar{x} \pm 1$ SD

2.4.1.2. Gruppen MC 2 und MC

Im Kollektiv der Patienten mit längerdauernder und/oder bereits therapierter Krankheit wurde, wie im Gesmtkollektiv der Crohn-Patienten, kein Einfluß der Krankheitsaktivität auf T- und B-Zellen offensichtlich.

Die Relativkonzentrationen der Null-Zellen jedoch zeigten eine Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität, und zwar einen im Vergleich zum entsprechenden Normalkollektiv NMC 2 signifikanten Anstieg bei Patienten mit aktiver Krankheit (Tab. 2b). Wir fanden auch eine Erhöhung der Absolutzahlen der Null-Lymphozyten über Normalwerte (Tab. 2b); allerdings war dieser mäßig und statistisch nicht signifikant. Verglichen wir jedoch die Absolutzahlen der Null-Zellen von MC 2 - Patienten mit hochaktivem Krankheitsgeschehen (CDAI > 2oo) mit den entsprechenden Werten von Patienten derselben Gruppe mit ruhender Krankheit (CDAI < 11o), erhielten wir eine signifikante absolute Null-Lymphozytose ($p < o,o5$).

2.4.2. Krankheitsdauer

In der Gesamtgruppe aller Crohn-Patienten zeigte sich eine statistisch signifikante Erniedrigung der absoluten Lymphozytenkonzentrationen sowie der Relativanteile und Absolutwerte der B-Zellen mit zunehmender Krankheitsdauer (Tab. 3).

2.4.3. Lokalisation

Auf die Zahl der B-Lymphozyten zeigte die Lokalisation der Krankheit keinen Einfluß. Die Relativanteile der T-Zellen im Gesamtkollektiv MC dagegen waren bei Patienten

mit Colonbefall signifikant niedriger als bei Patienten, deren Krankheit auf das Ileum beschränkt war ($p<0,01$). Umgekehrt waren in der Gruppe MC 2 die Prozentsätze der Null-Lymphozyten bei Patienten mit Colonbefall signifikant höher als bei den Kranken mit alleiniger Lokalisation im Ileum ($p<0,05$).

		Krankheitsdauer (Monate)		
		12 n = 7		49 n = 7
B-Lymphozyten	%	5,82 ± 2,33	<0,05	3,51 ± 1,31
	abs.	111 ± 55	<0,05	55 ± 31
	%	3,72 ± 1,70	=0,05	1,98 ± 1,05
	abs.	67 ± 34	<0,05	33 ± 24
	%	1,41 ± 0,78		0,98 ± 0,57
	abs.	30 ± 20		14 ± 9
	%	0,66 ± 0,38		0,54 ± 0,3
	abs.	12 ± 8		7 ± 5

Tab. 3: Einfluß der Krankheitsdauer auf die B-Lymphozyten bei Patienten mit M. Crohn
Alle Angaben: $\bar{x} \pm 1$ SD

C. DISKUSSION

Schon in früheren Studien (Strober et al.,1967; Meyers et al., 1976; Hoj and Freiesleben, 1976) waren erniedrigte absolute Lymphozytenzahlen bei Patienten mit Morbus Crohn beschrieben worden. Auch in dieser Arbeit lagen in der Gesamtgruppe der Patienten mit Enteritis regionalis die Werte der Lymphozyten, d.h. der Träger der spezifischen Immunität, deutlich, wenn auch nicht signifikant unter den Zahlen der gesunden und erkrankten Kontrollen. Diese Erniedrigung wurde allerdings überwiegend durch die signifikant verminderten Lymphozytenwerte bei Patienten mit lange bestehender und bereits therapierter Krankheit (Gruppe MC 2) verursacht, während sich die Zahlen bei Personen mit erstdiagnostiziertem und nicht behandeltem Morbus Crohn (Gruppe MC 1) im Normbereich bewegten.
Hier ist die Bedeutung der Stratifikation des Gesamtkollektivs in die Gruppen MC 1 und MC 2 bereits zu erkennen. Sie zeigt sich ebenfalls hinsichtlich der Frage, ob auch die Lymphozytensubpopulationen in ihren Relativanteilen und Absolutwerten erniedrigt seien. Unter Berücksichtigung der Untergruppen MC 1 und MC 2 fanden wir in dieser Studie bei Patienten der Gruppe MC 1 eine relative B-Lymphozytose und bei inaktiven Patienten dieser Gruppe sogar eine bislang nicht beschriebene Erhöhung der absoluten Lymphozytenzahlen, getragen von einer absoluten B- und T-Lymphozytose.

1. Die B - Lymphozytose

Die signifikante relative B - Lymphozytose in Gruppe MC 1 wurde gleichmäßig von allen drei Zellunterklassen (IgM-, IgG- und IgA-positiven Zellen) hervorgerufen. Diese Er-

höhung des B-Zellenanteils spiegelt wohl eine Aktivierung der humoralen Immunität wider. Die unauffälligen relativen T-Lymphozytenkonzentrationen schließen aus, daß es sich nur um eine kompensatorische Erhöhung des B-Zellenanteils handelt. Außerdem macht vor allem der eindeutige Anstieg auch der Absolutwerte der B-Lymphozyten (signifikant bei den inaktiven Patienten der Gruppe MC 1) eine Aktivierung der B-Zellinie deutlich.

Sekundäre Einflüsse auf das Immunsystem der Patienten dieser Gruppe waren weitgehend ausgeschlossen worden, da sie erst sehr kurze Zeit erkrankt (mittlere Krankheitsdauer ca. 13 Monate) und bisher nicht therapiert waren. Die gesteigerte Aktivität der B-Zellen könnte eine erhöhte Produktion von Antikörpern gegen zahlreiche exogene und endogene Antigene widerspiegeln. So wurden bei Morbus Crohn Antikörper gegen E. coli (Thayer et al., 1969; Deodhar et al., 1969), Lipoid A (Schüßler et al., 1976), bovines Serumalbumin (Falchuck and Isselbacher, 1976), aber auch gegen Autoantigene wie Lymphozytenoberflächenantigene (Lancet I, Editorial, 1976) und Colonepithelien (Thayer et al., 1969; Deodhar et al., 1969) beobachtet.

Auch Strickland et al.(1974) beschrieben eine relative und absolute Lymphozytose der IgM- und IgA-tragenden Zellen bei M. Crohn. Die Gesamt-B-Lymphozyten betrachtet Strickland als normal. Allerdings stellt in dieser Arbeit die IgG - positive Zellfraktion den größten Anteil der B-Zellen dar. Es ist aber mittlerweile einwandfrei bewiesen, daß die große Mehrheit der B-Zellen von IgM - positiven Zellen getragen wird (Winchester et al., 1975 und 1976; Lobo and Horwitz, 1976). Daher ist diesen Aussagen nur ein begrenzter Wert beizumessen.

2. Die T - Lymphozytose

Als weiteres wichtiges Ergebnis fällt im Gegensatz zu früheren Arbeiten, die sowohl erniedrigte (Strickland et al., 1974) als auch normale (Thayer et al., 1976 b) T-Lymphozytenwerte beschrieben, bei Patienten mit erstdiagnostizierter und inaktiver Krankheit eine absolute T-Lymphozytose auf. Dies beweist, daß am Beginn des Krankheitsgeschehens nicht nur keine primäre Reduktion, sondern sogar eine Vermehrung der Träger der zellulären Immunität, d.h. der T-Lymphozyten, vorliegt.

Auffallend ist die Ähnlichkeit der numerischen Verteilung der Immunzellen bei Patienten mit inaktivem nicht behandeltem M. Crohn und bei Patienten mit anderen entzündlichen Darmerkrankungen (Gruppe E), bei denen eindeutig eine Reaktion auf das Eindringen eines exogenen Agens vorliegt. Somit könnte sich die freilich sehr spekulative Frage aufdrängen, ob es sich hier um eine Immunantwort auf ein infektiöses ätiologisches Agens handelt. Dies würde die alte Auffassung einer infektiösen Genese des M. Crohn unterstützen, für die auch die histologische Ähnlichkeit mit der Tbc, verschiedenen Hautinfektionen (Mykobakterium leprae, Mykobakterium ulcerans, Mykobakterium balnei) und die Existenz eines übertragbaren Agens aus erkrankten Darmabschnitten oder befallenen Lymphknoten (Beeken et al., 1976) spricht. Auch die gute antibakterielle Wirksamkeit von SASP (West et al., 1974) und Metronidazol (Ursing and Kamme, 1975) würde im Hinblick auf die Ätiologie in diese Richtung weisen. Die spekulative Natur dieser Überlegungen sei jedoch nochmals betont.

Die bis jetzt diskutierten Veränderungen fanden sich lediglich in der Gruppe der erstdiagnostizierten Patienten.

Ganz anders verhielten sich die Lymphozytensubpopulationen in Gruppe MC 2.
Hier fand sich eine signifikante absolute B- und T-Lymphopenie gegenüber den alters- und geschlechtsgleichen gesunden Kontrollen, gegenüber dem Kollektiv der Erkrankten und der erstdiagnostizierten Crohn-Patienten. Dieser Einfluß auf die absoluten B- und T-Zellzahlen erfolgt jedoch nicht so sehr über die Veränderungen der Relativanteile, sondern über die signifikante Reduktion der Gesamtlymphozyten. Da sich das Kollektiv MC 2 von Gruppe MC 1 durch Therapie, aber auch durch eine lange Krankheitsdauer (Mittelwert ca. 61 Monate) unterscheidet, dürften die Erniedrigungen der Lymphozytenabsolutwerte im wesentlichen auf den später diskutierten Einfluß der Krankheitsdauer zurückzuführen sein (siehe C 3.2.).

3. Einflüsse verschiedener klinischer Parameter

3.1. Krankheitsaktivität

Die Einteilung aller unbehandelten Crohn-Patienten mit kurzdauernder Krankheit (MC 1) nach dem Aktivitätsgrad des Leidens eröffnete einen signifikanten suppressiven Einfluß dieses Parameters auf die absolute Gesamtlymphozytenzahl, die sowohl durch einen Abfall der B- als auch der T-Lymphozyten verursacht wurde. Diese Abhängigkeit der Immunzellen nur in Gruppe MC 1 und nicht länger in Gruppe MC 2 oder im Gesamtkollektiv MC deutet darauf hin, daß die Lymphozyten und ihre Subpopulationen mit der Zeit unter einen multifaktoriellen Einfluß gelangen. So können Einwirkungen anderer klinischer Parameter zu einem späteren Zeitpunkt nur mehr schwer eruiert werden.

Eine gegensätzliche Wirkung zeigte die Krankheitsaktivität

auf die Gruppe der Null-Zellen im Kollektiv MC 2.
Hier fand sich bei den aktiven Patienten (CDAI > 150) ein Anstieg des Relativanteils der Null-Lymphozyten, aus dem eine Erhöhung der Absolutwerte resultierte. Da sich diese Veränderungen nur in der Gruppe der bereits länger erkrankten Patienten nachweisen ließ, scheint diese Null-Zell-Aktivierung sekundär im Krankheitsverlauf in Erscheinung zu treten. Inwieweit dies auch die Zytotoxizität gegenüber Colonepithelien betrifft, die durch K-Zellen, welche u.a. eine Untergruppe der Null-Lymphozyten darstellen (Stobo et al., 1976; Auer et al., 1978), vermittelt wird, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar.

3.2. Krankheitsdauer

Mit steigender Krankheitsdauer zeigte sich eine Abnahme der relativen und absoluten Konzentrationen der B-Lymphozyten, die von allen drei Unterklassen getragen wurde (statistische Signifikanz in der Gruppe der IgM-tragenden Zellen; Tab. 3). Dieser Einfluß könnte für die absolute B-Lymphopenie in Gruppe MC 2, die sich definitionsgemäß aus Patienten mit langdauernder und/oder therapierter Krankheit zusammensetzt, verantwortlich sein.
Der Rückgang der Anzahl der B-Zellen ist nicht nur auf das beträchtliche Absinken der Relativanteile, sondern vor allem auf eine deutliche Gesamtlymphopenie zurückzuführen. Letztere erklärt auch die parallellaufende T-Lymphopenie im selben Kollektiv.

Diese Zellzahlerniedrigungen mit steigender Krankheitsdauer weisen auf das Einwirken sekundärer Krankheitseinflüsse hin, die im Gefolge eines langen Krankheitsverlaufes leicht auftreten können. Diese Ansicht steht in Einklang mit Ergebnissen einer Arbeit von Strickland et

al. (1975), die eine Rückkehr der verminderten Lymphozytenzahlen zur Norm nach Resektion des befallenen Darmabschnittes aufweist.

Die Natur dieser sekundären Einflüsse ist noch unklar. Diskutiert werden ein Zusammentreffen von Sequestration der Lymphozyten in der Darmwand mit gesteigertem Verlust ins Darmlumen (Strickland et al., 1975; Douglas et al., 1976); auch verminderte Produktion könnte die Ursache sein. Außerdem wäre anzuführen, daß die Verminderung der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen den Einfluß vergangener immunsuppressiver Therapie widerspiegeln könnte, die nachweislich (Yu et al., Cooper et al., 1977) zu einem Abfall der zirkulierenden Lymphozyten, vornehmlich der T-Zellen führt. Thayer et al. (1976) berichten von einem in vivo suppressiven Effekt von SASP auf EAC-Rosetten-bildende Zellen. Diese Lymphozyten, die mit antikörper- und komplementbeladenen Schafserythrozyten Rosetten bilden, sind bei Gesunden gemäß einer Studie von Ehlenberger et al. (1976) identisch mit derjenigen Population von SmIg-positiven Zellen, die nach Entfernung der Makrophagen und Vorinkubation bei 37°C mittels $F(ab)_2$-Fragmenten ermittelt wurde. So könnte der von Thayer festgestellte supprimierende Einfluß der SASP-Therapie auf die EAC-Rosetten unsere Beobachtung der absoluten Lymphopenie in Gruppe MC 2 erklären. Diese Gruppe unterscheidet sich vom Kollektiv MC 1 eben auch durch die vorangegangene Therapie.
Thayer jedoch sieht die Therapie als alleinige Ursache für die Reduktion der absoluten Lymphozytenzahlen anderer Autoren an. Daß dem nicht so sein kann, zeigt die Tatsache, daß einige Patienten in Gruppe MC 2 schon seit Jahren keine Medikamente erhalten hatten und dennoch erneut

rigte Lymphozytenzahlen aufwiesen.

Auch eine Arbeit von Hoj and Freiesleben (1976) ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert. Hier wird ebenfalls ein Abfall der Absolutkonzentrationen aller Lymphozytensubpopulationen bei Crohn-Patienten nachgewiesen. Da in den meisten untersuchten Crohnkollektiven gewöhnlich schon therapierte Patienten mit längerdauernder Krankheit den größten Teil des Krankenguts stellen, stünden unsere in Gruppe MC 2 gefundenen Ergebnisse in Übereinstimmung mit denjenigen der erwähnten Studie. Allerdings wurden zur Bestimmung der B-Zellen offenbar komplette Antikörper verwendet, ersichtlich an den hohen IgG-Werten. Dies macht wegen der eingangs erwähnten methodischen Schwierigkeiten einen direkten Vergleich unmöglich.

Die diskutierten Daten zeigen, daß die absoluten Konzentrationen der T- und B-Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn in einigen Fällen erniedrigt sind. Dieser Befund tritt wohl sekundär zur Aktivität und Chronizität der Erkrankung sowie möglicherweise als Folge vorangegangener Therapie in Erscheinung.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen ein dynamisches Verhalten der Träger der zellulären und humoralen Immunität, d. h. der B- und T-Lymphozyten bei Patienten mit M. Crohn in Abhängigkeit von Klinik, Dauer und Therapie der Erkrankung auf.

Durch Verwendung von $F(ab)_2$-Fragmenten zum immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis der SmIg-positiven Zellen anstelle von kompletten Antikörpern gelang es, methodikabhängige falsch-positive Ergebnisse durch Bindung autologer Serumimmunglobuline über den Fc-Rezeptor zu vermeiden. Außerdem wurde durch Vorinkubation bei 37°C eine Anlagerung von zytophilen Autoantikörpern verhindert, die in früheren Arbeiten ebenfalls zu einer Erhöhung der Zahl der fluoreszeierenden, als B-Zellen betrachteten Lymphozyten führte. So konnte erstmals das numerische Verteilungsmuster der e c h t e n B-Zellen aufgezeigt werden.

Die Stratifikation des heterogenen Kollektivs der Crohn-Patienten gemäß einer Minimierung und Maximierung von Krankheitseinflüssen auf das Immunsystem führte zu einer Gruppe von Patienten mit kurzdauernder, nicht behandelter Krankheit und zu einem zweiten Probandenkollektiv mit langdauerndem und bereits therapiertem Leiden. Dies brachte einige neue Erkenntnisse. Es erwies sich, daß bei M. Crohn am Beginn der Erkrankung nicht nur keine R e d u k t i o n, sondern sogar eine E r h ö h u n g der Träger der humoralen und zellvermittelten Immunität vorliegt (Ergebnisse in Gruppe MC 1). Erst im weiteren Verlauf kommt es zu einer Reduktion der Zahl der peripheren Blutlymphozyten in Abhängigkeit von Aktivität, Dauer und Therapie der Erkran-

kung (Ergebnisse in Gruppe MC 2).

Der Vergleich des Crohnkollektivs mit Patienten, die an anderen entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes außer M. Crohn und Colitis ulcerosa litten (Gruppe E), ergab eine überraschende Ähnlichkeit des Reaktionsmusters der B- und T-Lymphozyten von erstdiagnostizierten inaktiven Crohnpatienten und von Patienten der Gruppe E. Dies könnte als Hinweis auf eine Immunantwort auf ein exogenes infektiöses Agens gewertet werden oder aber Ausdruck einer als Folge der Entzündung gesteigerten Permeabilität der Mukosa sein, die zu einer erhöhten Absorption intestinaler Antigene führt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Alexander, B.L., Sander, S.S.K.: $F(ab)_2$ reagents are not required if goat, rather than rabbit antibodies are used to detect human surface immunoglobulines. J. Immunol. 119: 1o84, 1977

Aluwihare, A.P.: Electron microskopy in Crohn's disease. Gut 12: 5o9, 1971

Auer, I.O., Ziemer, E., Wechsler, W., Malchow, H., Sommer, H., Buschmann, Ch.: Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn. T- und B-Lymphouytenzahlen sowie antikörperabhängige zellvermittelte Immunität (Killer-Zellen). 31. Tagung der Dt. Gesellsch. f. Verdauungs- u. Stoffwechselkrankheiten. Zschr. f. Gastroenterol.: Abstract 3o, 1976

Auer, I.O., Wechsler, W., Ziemer, E., Malchow, H., Sommer, H.: Immune status in Crohn's disease. I. Leucocyte and lymphocyte subpopulations in peripheral blood. Scand. J. Gastroenterol. 13: 561 - 571, 1978

Best, W.R., Becktel, J.M., Singleton, J.W., Kern, F.: Development of a Crohn's disease activity index. National cooperative Crohn's disease study. Gastroenterology 7o: 439, 1976

Beeken, W.L., Mitchel, D.N., Cave, D.R.: Evidence for a transmissible agent in Crohn's disease. Clin. Gastroenterol. 5: 289 - 3o2, 1976

Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by combining centrifugation and sedimentation by 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97): 77, 1968

Cooper, D. A., Petts, V., Luckhorst, E., Penny, R.: The effect of acute and prolonged administration of prednisolone and ACTH on lymphocyte subpopulations. Clin. Exp. Immunol. 28: 467, 1977

Crohn, B.B., Ginzburg,L., Oppenheimer, G.D.: Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. J. Amer. Med. Ass. 99: 1323, 1932

Deodhar, D., Michener, W.M., Farmer, P.G.: A study of the immunologic aspects of chronic ulcerative colitis and transmural colitis. Amer. U. Clin. Pathol. 51: 591, 1969

Doe, W.F., Booth, C.C., Brown, D.L.: Evidence for complement binding immuncomplexes in adult coeliac disease, Crohn's disease and ulcerative colitis. Lancet I, 402, 1973

Douglas, A.P., Weetman, N.P., Haggith, J.W.: The distribution and enteric loss of ^{51}Cr-labelled lymphocytes in normal subjects and in patients with coeliac disease and other disorders of the small intestine. Digestion 14: 29, 1976

Ehlenberger, A.G., McWilliams M., Phillips-Quagliata J.M. et al.: Immunoglobulin-bearing and complement-receptor lymphocytes constitute the same population of human peripheral blood. J. Clin. Invest. 57: 53 - 56, 1976

Eidelmann, S., Lagunoff, D.: The morphology of the normal human rectal biopsy. Hum. Path. 3: 389, 1972

Falchuck, K.R., Isselbacher, K.J.: Circulating antibodies to bovine albumin in ulcerative colitis and Crohn's disease. Characterization of the antibody response. Gastroenterology 70: 5 - 8, 1976

Fahrländer, H., Shalev, E.: Die Enterocolitis regionalis Crohn. Eine Verlaufs- und Vergleichsstudie anhand von 182 Patienten. Dtsch. Med. Wschr. 99: 2207, 1974

Ferguson, R.N.A., Cooke, W.T.: A study of the cellular infiltrate of the proximal jejunal mucosa in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut 16: 205, 1975

Galili, U., Schlesinger, M.: The formation of stable E-rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. J. Immunol. 112: 1628, 1974

Hodgson, H.J.F., Potter, B.J., Jewell, D.P.: Immune complexes in ulcerative colitis and Crohn-s disease. Clin. Exp. Immunol. 29: 187, 1977

Hoj, L., Freiesleben, S.S.: Lymphocyte subpopulations in chronic inflammatory bowel disease. Scand. J. Gastroenterol. 11, Suppl. 38: 91, Abstract 1976

Lancet, Editorial: Lymphocytotoxic antibodies. Lancet I: 785, 1976

Lobo, P.J., Horwitz, D.A.: An appraisal of Fc receptors on human peripheral blood B and T lymphocytes. J. Immunol. 117: 939, 1976

Lockhart-Mummery, H.E., Morson, B.C.: Crohn's disease of the large bowel. Gut 5: 493, 1964

Mendes, N.F., Marina, E.A., Nelson, B.A.: Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte binding (T) lymphocytes. J. Immunolog. 111: 860, 1973

Meyers, S., Sachar, D.B., Taub, R.N., Janowitz, H.D.: Anergy to dinitrochlorbenzene and depression of T-lymphocytes in Crohn's disease and ulcerative colitis. Gut 17: 911, 1976

Morson, B.C.: Histopathology of Crohn's disease. Proc. Roy. Soc. Med. 61: 79, 1968

Pernis, B., Forni, L., Amante, L.: Immunoglobulines as cell receptors. Ann. N.Y.Acad.Sci. 19o: 42o, 1971

Reid, K.B.Ch.: Complement fixation by the $F(ab)_2$-fragment of pepsin treated rabbit antibody. Immunology 2o: 649, 1971

Sachar, D.B., Taub, R.N., Rachamandar, K., et al.: T and B lymphocytes and cutaneous anergy in inflammatory bowel disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 278: 565, 1976

Schettler, G., et al.: Enteritis regionalis. Innere Medizin, Band II, 399, 1976

Schiller, K.F.R. et al.: Crohn's disease of the mouth and lips. Gut 12: 864, 1971

Schlossmann, S.F., Chess, L.: Immunologic functions of a subset of human null cells. In Clinical Evaluation Of Immune Function In Man. Edited by S.D.Litwin, Ch.Christian, G.W.Siskind. New York, Grune and Stratton, 1976, S. 65 ff.

Schüßler, P., Kruis, W., Marget, W.: Lipoid-A-Antikörper bei Morbus Crohn. Klin. Wschr. 54: 1o55, 1976

Sedlacek, H.H., Dersjant, H., Baudner, S., Seiler, F.R.: Critical evaluation of the value of immunofluorescence methods for the demonstration of immunoglobulins on the lymphocyte surface. Behring Inst. Mitt. 59: 38, 1976

Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., Aas, J., Guy, S.K.: Cytophilic antibody and the cytotoxicity of lymphocytes for colonic cells in vitro. Am. J. Dig. Dis. 16: 673, 1971

Sommers, S.C., Korelitz, B.J.: Mucosal cell counts in ulcerative and granulomatous colitis. Am. J. Clin. Pathol. 63: 359, 1975

Stobo, J.D., Tomasi, T.B., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., Shorter, R.G.: In vitro studies on inflammatory bowel disease. Surface receptors of the mononuclear cell required to lyse allgenetic colonic epithelial cells. Gastroenterology 7o: 171, 1976

Strickland, R.G., Korsmeyer, S., Soltis, R.D., Wilson, I. D., Williams, R.C.: Peripheral blood T- And B-cells in chronic inflammatory bowel disease. Gastroenterology 67: 569, 1974

Strickland, R.G., Husby, G., Black, W.C., Williams, R.C.: Peripheral blood and intestinal lymphocate subpopulations in Crohn's disease. Gut 16: 847,1975

Strober, W., Wochner, R.D., Carbone, P.P.: Intestinal lymphangiectasia: A protein-losing enteropathy with hypogammaglobulinemia, lymphocytopenia and impaired homograft reaction. J. Clin. Invest. 46: 1643, 1967

Thayer, W.R., Brown, M., Sangree, M.H., Katz, J., Hersh,Th.: Escherichia coli o:14 and colon hemagglutinating antibodies in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 57: 311, 1969

Thayer, W.R., Charland, C., Field, C.: Salazopyrin and its effect on lymphocyte subpopulations and function. Gastroenterology 7o: 942, 1976

Thayer, W.R., Charland, C., Field, C.: The subpopulations of circulating white blood cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 71: 379, 1976 b

Ursing, B., Kamme, C.: Metronidazole for Crohn's disease. Lancet I: 775, 1975

Watson, D.W., Shorter, R.G.: The immunology of ulcerative colitis and Crohn's disease: Cell mediated immune response. in: Inflammatory bowel disease. Hsgb.: Kirsner, J.B., Shorter, R.G.Lea & Febiger, Philadelphia 1975, S. 81 ff.

West, B., Lencrum, R., Hill, M.J. et al.: Effects of sulphasalazine (Salazopyrin) on faecal flora in patients with inflammatory bowel disease. Gut 15: 96o, 1974

Winchester, R.J., Winfield, J.B., Siegal, F. et al.: Analyses of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematodes. Occurrence of interfering cold-reactive antilymphocyte antibodies. J. Clin. Invest. 54: 1o82, 1974

Winchester, R.J., Fu, S.M., Hoffman, T., Kunkel, H.G.: IgG on lymphocyte surfaces; technical problems and the significance of a third cell population. J. Immunol. 114: 121o, 1975

Winchester, R.J., Fu, S.M., Wang, C.Y., Hoffmann, T., Kunkel, H.G.: Lymphocyte surface markers: Evidence for three subpopulations of Fc-receptor bearing lymphocytes. In: Clinical Evaluation Of Immune Function In Man. Hsgb. Litwin, S.D., Christian, Ch., Siskind, G.W. Grune and Stratton, New York, 1976, S. 1 ff.

Yu, D.T.Y., Clements, P.J., Paulus, H.E., Peter, J.B., Levy, J., Barnett, E.V.: Human lymphocyte subpopulations. Effect of corticosteroids. J. Clin. Invest. 53: 565, 1974

Herrn PD Dr. med. I. O. A u e r danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei seiner Bearbeitung.

Herrn Prof. Dr. med. H. A. K ü h n danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frl. Ch. B u s c h m a n n und Herrn Dr. med. E. Z i e m e r sowie Frl. R. H i l b e r t danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

LEBENSLAUF

Am 14. 7. 1954 wurde ich als zweites von drei Kindern des Dipl. Ing. Otto Götz und seiner Ehefrau Luise, geb. Huck, in Bad Mergentheim geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Würzburg. Im September 1964 trat ich in das Städtische Mozartgymnasium Würzburg ein, wo ich im Mai 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich an der Universität Würzburg das Studium der Medizin.
Nach bestandenem 2. Teil der Ärztlichen Prüfung verbrachte ich das anschließende praktische Jahr im Lehrkrankenhaus in Coburg.

Am 23. Oktober 1979 schloß ich mein Studium mit dem 3. Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Am 6. November 1979 erhielt ich die Approbation als Ärztin.

Silvia Götz